

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 243**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/60** (2007.01)

**B01J 13/16** (2006.01)

**B01J 13/00** (2006.01)

**B82Y 5/00** (2011.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2006 PCT/IT2006/000167**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.09.2007 WO07108016**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2006 E 06745236 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2001514**

54 Título: **Preparación de sistemas micro o nano basados en óxidos inorgánicos con porosidad controlada para el transporte de sustancias biológicamente activas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.10.2017**

73 Titular/es:

**NANOSILICAL DEVICES SRL (100.0%)**  
**Via P. Bucci**  
**87036 Rende, IT**

72 Inventor/es:

**AIELLO, ROSARIO;**  
**MAIONE, UMBERTO;**  
**PASQUA, LUIGI y**  
**TESTA, FLAVIANO**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 638 243 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## Preparación de sistemas micro o nano basados en óxidos inorgánicos con porosidad controlada para el transporte de sustancias biológicamente activas

### Descripción

5

#### CAMPO DE LA INVENCIÓN

10 **[0001]** La invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un sistema multifuncional que utiliza un óxido inorgánico con porosidad controlada que lleva una especie activa biológica (drogas) y, al mismo tiempo, apoya sobre la superficie externa una función de orientación con actividad biológica capaz, en particular, de ser reconocida por tejidos biológicos particulares.

#### ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15 **[0002]** En los últimos años, los investigadores MOBIL introdujeron la familia de tamices moleculares mesoporosos llamados M41S. La fase llamada MCM-41 es el miembro de la familia M41S caracterizada por una matriz hexagonal regular de mesoporos de diámetro uniforme. Se sintetizan usando tensioactivos catiónicos como agentes estructurantes (CT Kresge, ME, Leonowicz, WJ Roth, J. C Vartuli, JS Beck, Nature, 359, (1992), 710-712, J.S. Beck, J.C. Vartuli, V.J. Roth, M.E. Leonowicz, C.T. Kresge, K.D. Schmitt, C.T.W. Chu, D.H. Olson, E.W. Sheppard, S.B. McCullen, J.B. Higgins y J.L. Schlenker, J. Am. Chem. Soc. 114 (1992) 10834). Se han obtenido materiales mesoporosos usando tensioactivos aniónicos (Q. Huo, DI Margolese, U. Cielsa, P. Feng, TE Gier, P. Sieger, R. Leon, P. Petroff, F. Schüth, G.D. Stucky, Nature, 1994, 368, 317) y tensioactivos neutros tales como alquilamina con cadena larga [PT Tanev, TJ Pinnavaia, Science, 1995, 267, 865] y óxidos de polietileno [G. Attard, J.C. Glyde, C.G. Göltner, Nature, 1995, 378, 366; S.A. Bagshaw, E. Prouzet y T.J. Pinnavaia, Science, 1995, 269, 1242; D. Zhao, J. Feng, Q. Huo, N. Melosh, G.H. Fredrickson, B.F. Chmelka, GD Stucky, Science, 1998, 279, 548; D. Zhao, Q. Hou, J. Feng, B.F. Chmelka, GD Stucky, J. Am. Chem. Soc., 1998, 120, 6024]. El diámetro de los mesoporos se puede adaptar de aproximadamente 20 Å a aprox. 100 Å dependiendo del tensioactivo y de los aditivos utilizados en la síntesis. El tipo de aluminosilicato MCM-41 se ha considerado desde su descubrimiento como la extensión natural de zeolitas y campos inmediatamente de aplicaciones tales como catálisis o procesos de separación de sustratos estéricamente impedidos demasiado grandes para difundir en las estrechas zeolitas micropores se han definido. El descubrimiento de la sílice mesoporosa ordenada abrió la ruta para nuevos desarrollos, por ejemplo en la síntesis "huésped-huésped" de materiales nanoestructurados. Se han creado sitios activos con alta definición mediante injerto de complejos metalocenos sobre sílices mesoporosas. Las estrategias de síntesis ofrecidas por la química de los procesos sol-gel junto con la capacidad de los tensioactivos para las mesofasas líquido-cristalinas de autoensamblaje representa un código modular que permite desarrollar materiales innovadores con arquitecturas complejas que convierten el sustrato ideal en el diseño de una estructura nanofuncional. La hibridación de un precursor inorgánico permite, de hecho, el diseño y el desarrollo de materiales multifuncionales innovadores con estructura compleja y con diversas propiedades. Se han obtenido materiales inorgánicos orgánicos híbridos unidos covalentemente a la estructura inorgánica de los materiales mesoporosos mediante injerto post-síntesis o mediante condensación simultánea de reactivos silosánicos y organosilossánicos, estando provisto este último de un enlace Si-C no hidrolizable.

45 **[0003]** La síntesis de materiales mesoporosos hidrófobos para la eliminación simultánea del tensioactivo de estructuración y la modificación de la superficie externa se ha obtenido tratando el material MCM-41 con trialquilclorosilanos. Recientemente se ha descrito la preparación de silicatos y aluminosilicatos mesoporosos con diferentes métodos de síntesis y su modificación química de la superficie. Se puede utilizar un volumen de poro típico de los materiales activados con porosidad regular para inmovilizar invitados moleculares con una clase o estructura muy diferente. Entre las diferentes aplicaciones posibles, las que se refieren a moléculas biológicamente activas, con particular atención a la liberación controlada de fármacos, parecen ser muy prometedoras.

50 **[0004]** Las enzimas y proteínas pueden adsorberse en la superficie hidroxilada de óxidos inorgánicos activados o en las paredes de los poros funcionalizados de materiales híbridos con porosidad regular. Se han estudiado sílices mesoporosas MCM-41 para la inmovilización de fármacos antiinflamatorios no esteroideos proporcionados por un grupo funcional ácido carboxílico. El confinamiento en la matriz puede obtenerse por fisisorción de la molécula o por injerto químico, por ejemplo, sobre la superficie de sílice adecuadamente funcionalizada. [M. Vallet-Regi, A. Ramila, R.P. Del Real y J. Perez pariente, Chem. Mater., 2001, (13), 308; G.Cavallaro, P. Pierro F.S. Palumbo, F. Testa, L. Pasqua, R. Aiello Drug Delivery 11, 41-46, 2004; B. Muñoz, A. Ramila, J. Pérez Pariente, I. Diaz y M. Vallet Regi, Chem. Mater., 2003, 15.500; A. Ramila, B. Munoz, J. Perez Pariente, M. Vallet-Regi, J. Sol-Gel Sci. Technol., 26 (2003) 1199; C. Tourné-Péteihl, D. Brunel, S. Bégu, B. Chiche, F. Fajula, D. Lerner JM Devoisselle, New. J. Chem., 27 (2003) 1415]. En este último caso [New. J. Chem., 27 (2003) 1415] fármaco ibuprofen ha sido unido covalentemente a la superficie de MCM-41 de tipo sílice mesoporosa. La esterificación se ha realizado utilizando el grupo ibuprofeno carboxílico en la abertura del anillo epoxídico de 3-glicidoxipropilsilano injertado sobre la superficie de sílice. Un sistema similar basado en un pro-fármaco implica la ventaja debido a la activación enzimática a través de la rotura del enlace éster debido a la esterasa "in vivo".

65 **[0005]** Péptido de pentagastrina, un activador de la secreción gástrica, se ha introducido a través de remojo de la

solución en una sílice mesoporosa sintetizada utilizando un tipo de tensioactivo Tween-80 [C. Tourné-Péteihl, D.A. Lerner, C. Charnay, L. Nicole, S. Bégu, J.M. Devoisselle, ChemPhysChem, 3 (2003) 281]. Recientemente, un sistema para la liberación controlada de fármacos con nanoesferas de sílice mesoporosa de MCM-41 ha sido optimizada. Tapas químicamente extraíbles de nanocristales de sulfuro de cadmio con el fin de sostener diferentes fármacos y neurotransmisores dentro del marco mesoporoso se han utilizado [C. Lai, B.G. Trewyn, D.M. Jeftinija, K. Jeftinija, S. Xu, S. Jeftinija, V.S. Lin, J. Am. Chem. Soc., 125 (2003) 4451].

**[0006]** El uso de materiales y sistemas a escala nanométrica está en rápido desarrollo sólo a partir de unos pocos años. Se han propuesto recientemente enfoques nanotecnológicos dedicados no sólo a la liberación controlada de fármacos, sino también a la imagen molecular y al uso como biomarcadores o biosensores. Diferentes experimentos afrontan el uso de materiales a base de sílice. En 1999 se han patentado vidrios de sílice que incorporan moléculas biológicas como sistemas para la liberación controlada de fármacos [Patente de EE.UU., n. 5.874.109, 1999]. El sistema Therasphere® es un nuevo sistema terapéutico, comercializado por MDS Nordion, utilizado como agente radioterápico local en el carcinoma hepático. Está hecho de microesferas de vidrio insolubles parcialmente constituidas por un emisor  $\beta$  introducido a través de la arteria hepática.

**[0007]** La orientación activa de un fármaco en un tejido característico puede basarse en el reconocimiento de un grupo funcional unido a una molécula preseleccionada.

**[0008]** El ácido fólico se puede emplear en la orientación activa de un medicamento. Los receptores de ácido fólico, de hecho, constituyen un objetivo útil en el transporte activo de fármacos antitumorales.

1) De hecho, están sobre-regulados en muchas tipologías de cáncer humano incluyendo tumores malignos, colorrectales, de ovario, de cerebro, de riñón, de mama, de pulmón, células mieloides, permitiendo a las células neoplásicas, en caso de disponibilidad limitada, un suministro competitivo.

2) El acceso al receptor de folato en los tejidos normales que lo expresan está seriamente restringido por su posición en la cara externa de la membrana apical de los epitelios polarizados.

3) La densidad de los receptores de folato parece aumentarse con el aumento de la enfermedad. Aunque el mecanismo de transporte del ácido fólico en la célula por el receptor de folato no es claramente conocido. Es evidente que el folato conjugado es asumido por las células de los mamíferos a través de un proceso de endocitosis mediado por el receptor. Los mecanismos de endocitosis implican partículas menores de 100 nm. Sucesivamente a la conjugación con el receptor de folato en la superficie de la célula tumoral, el conjugado de folato independientemente del tamaño penetra y es conducido a compartimentos intracelulares llamados endosomas. Los endosomas que contienen folato conjugado presentan un valor de pH de aprox. 5 debido a un proceso llamado acidificación de endosomas que es responsable de la disociación entre conjugado y receptores [Y. Lu, PSLow, Adv. Droga. Deliv. Rev., 54 (2002) 675].

**[0009]** El direccionamiento de los receptores de folato puede ser empleado para la liberación intracelular de agentes terapéuticos macromoleculares [K.Kono, M.Liu, JMJ Frechèt, Bioconjugate Chem., 1999, 10, 1115], sino también medicamentos que no necesitan liberación intracelular puede llevarse a tejidos neoplásicos. De este modo tumores de tratamiento terapéutico difícil con métodos clásicos se pueden alcanzar usando específicamente agentes terapéuticos conjugados-ácido fólico.

**[0010]** Con el objetivo de explotar las características de la sobreexpresión del receptor de ácido fólico éste se ha conjugado a ambos fármacos de bajo peso molecular y a complejos macromoleculares como agente de direccionamiento molecular de moléculas unidas a las células neoplásicas. Sistemas basados en poliéter con residuos de folato en la superficie externa como vehículos de fármacos activos con potencialidad específica entre las células tumorales, se han preparado [K.Kono, M.Liu, J.M.J. Frechet, Bioconjugate Chem., 1999, 10, 1115].

**[0011]** A nanodispositivo para la liberación del fármaco que permite una liberación intracelular y, al mismo tiempo, tiene propiedades de formación de imágenes obtenidas mediante la unión covalente de fluoresceína, metotrexato y ácido fólico, a la superficie de un núcleo etilendiamínico de un dendrímero a base de polyamidoamina [A. Quintana, E. Raczka, L. Piehler, I. Lee, A. Myc, I. Mayoros, A.K. Patri, T. Thomas, J. Mulè, JR Baker Jr, Pharm. Res. 19 (2002) 1310]. Recientemente, se ha preparado y caracterizado una folato-ciclodestrina conjugada [P. Caliceti, S. Salmaso, A. Semenzato, T. Carofiglio, R. Fornasier, M. Fermeiglia, M. Ferrone, y S. Pricl, Bioconjugate Chem., 2003, 14, 899]. La conjugación de ácido fólico con las macromoléculas produjo sistemas que mostraron liberación de fármacos "in vitro" en células tumorales que expresan receptores de ácido fólico en casi todas las situaciones. La focalización macromolecular mediada por el ácido fólico produjo sólo resultados parciales "in vivo" debido al problema relacionado con la penetración de tumores sólidos por las macromoléculas. De todos modos, los ejemplos en los que el transporte de folato ha mejorado significativamente los resultados de una terapia basada en vectores macromoleculares, conduce en muchos casos a una recuperación completa.

- En el documento FR 2794115 se ha tratado un sol de sílice de nanopartículas con un tamaño medio entre 3 y 50 nm en su superficie por injerto o adsorción de una molécula orgánica o por dopado con una sustancia dopante. Estas sustancias se han monodispersado en fase líquida y muestran una concentración superior o igual al 10%.

- En el documento USP 6548264 se reivindica un nuevo método para la preparación de nanopartículas cuyo núcleo está envuelto en una envoltura de sílice. Las nanopartículas se han preparado por precipitación a partir de reactivos disueltos en el medio acuoso de una emulsión agua-en-aceite. Se ha añadido un silicato reactivo para revestir el núcleo de las nanoemulsiones. Las partículas de sílice revestidas han sido funcionalizadas utilizando diferentes métodos con el objetivo de utilizarlos, por ejemplo, como partículas dopadas con tinte, metálicas, semiconductoras, magnéticas y que contienen fármacos.

**[0012]** Las nanopartículas de núcleo que tiene un diámetro medio inferior a 1 micrómetro y preferiblemente oscila entre 1 y 100 nm o 2 y 10 nm puede ser magnético y puede incluir un metal elegido entre magnetita, megmita y greigita. En otros casos, el núcleo puede incluir un pigmento que puede ser permanganato de potasio, dicromato de potasio, sulfato de níquel, cloruro de cobalto, cloruro de hierro (III) y nitrato de cuprum. De la misma manera puede incluir un colorante como Ru/Bpy, Eu/Bpy y similar o un metal como Ag o Cd. La cáscara de sílice que recubre las nanopartículas puede derivatizarse con un grupo funcional como una proteína (por ejemplo, un anticuerpo), un ácido nucleico (por ejemplo, un oligonucleótido) biotina o estreptavidina. Finalmente, el propuesto en la invención puede usarse para producir nanopartículas revestidas con sílice derivadas con proteínas que contienen un metal tal como magnetita, maígmite o greigita. En otro aspecto, la invención presenta un método para identificar células que expresan molécula preseleccionada. En este caso, una pluralidad de células en las que al menos una parte de ellas expresan la molécula particular que se mezcla con una pluralidad de nanopartículas recubiertas con sílice en condiciones que permiten que las nanopartículas se unan específicamente a las células que expresan la molécula preseleccionada. En otra realización, las nanopartículas revestidas con sílice son fluorescentes. La nanopartícula es sólida y preferiblemente sin poros pero para algunas aplicaciones puede hacerse porosa degradando el recubrimiento de nanopartículas con un agente corrosivo y eventualmente reconstruyéndolo con sílice. En general, se prefieren las partículas sólidas cuando se desea aislarlas del entorno exterior, mientras que aquellas porosas son preferidas cuando se desea aumentar el área superficial del revestimiento en contacto con el entorno exterior. El núcleo puede estar formado por cualquier sustancia compatible con el revestimiento con el objetivo de satisfacer requisitos particulares para la aplicación para el uso de la partícula. Como ejemplo, cuando la partícula necesita ser magnética, el núcleo está constituido por un metal magnético y las partículas pueden utilizarse en aplicaciones tales como separación/purificación de células o formación de imágenes de diagnóstico. El núcleo también puede estar hecho de una mezcla de diferentes sustancias. Como ejemplo, en una partícula magnética y dopada con colorante, el núcleo puede estar constituido por un metal magnético y una sal inorgánica útil como pigmento. El núcleo puede tener cualquier tamaño pero debe ser inferior al de la partícula deseada. Para ciertas aplicaciones, el núcleo debe tener preferiblemente un diámetro comprendido entre 1 y aprox. 200 nm. Como ejemplo, dado que las partículas con un tamaño inferior a 100 nm pueden ser excretadas por los animales, mientras que las de mayor diámetro pueden ser retenidas especialmente en el hígado y en el bazo, en el caso en que se prefieran las aplicaciones diagnósticas y terapéuticas y por consiguiente se recomienda que las partículas no están retenidas, el núcleo debe ser suficientemente pequeño para estar contenido en una partícula con tamaño inferior a 100 nm. El recubrimiento puede realizarse con un polímero (poliestireno, cloruro de polivinilo, polímeros acrílicos), un polisacárido como destrano, un óxido inorgánico como alúmina, sílice o una mezcla de los mismos. En muchas aplicaciones se prefiere la sílice porque es relativamente inerte en muchos ambientes, es biocompatible, previene la aglomeración con otras nanopartículas en una dispersión y puede derivatizarse fácilmente con muchos grupos funcionales. El recubrimiento puede ser realizado por una capa que recubre el núcleo y por una segunda capa que recubre la primera. Esta segunda capa puede estar hecha de un material biodegradable, por ejemplo un azúcar o un polímero, impregnado con un fármaco. Este material biodegradable, cuando se introduce en un organismo animal, puede disolverse y el fármaco puede difundirse gradualmente. El recubrimiento puede hacerse mediante 3, 4, 5 o más capas separadas. Los grupos funcionales pueden ser derivatizados en el revestimiento. Pueden ser cualquier función química o biológica que pueda estar unida a la nanopartícula a través del recubrimiento: como ejemplo, una o más proteínas tales como anticuerpos (monoclonales, policlonales), enzimas, biotina, estreptavidina, moléculas de ácidos nucleicos, quimiosensores, sondas fluorescentes y grupos bioquímicos como aminos y grupos de carboxilato.

**[0013]** El documento USP 6.548.264 describe un sistema no basado en un óxido con porosidad ordenada pero una tipología general de nanopartículas hecha de una sílice o cualquier otro material concha que contiene un núcleo de diferente naturaleza y composición. La porosidad se obtiene finalmente en la concha por métodos químicos. Cuando se desea la funcionalización en la concha, se finaliza a la interacción específica basada en el reconocimiento de una especie característica y en la separación. Cuando los sistemas están impregnados con un fármaco, se liberan después de la erosión de una capa erosionable adicional creada en la envuelta que eventualmente se hace porosa.

**[0014]** El documento US 6.319.715 reivindica una metodología para mejorar la liberación de moléculas de ácido nucleico a las células "in vitro" por medio de la formación de un complejo ácido-transfección de agente-nanopartícula nucleico. El método prevé la incubación de nanopartículas de sílice con el ácido nucleico. Los complejos de ácido nucleico-nanopartículas se dejan sedimentar sobre las células. La liberación de material genético en las células se lleva a cabo a través de agentes de transfección estándar. El requisito esencial de las nanopartículas es que son no tóxicas y biocompatibles, capaces de asociarse con ácidos nucleicos o con complejos de ácidos nucleicos y pueden sedimentar en un medio acuoso para aumentar la concentración de ácido nucleico en la superficie de las células. Es preferible que no formen agregados.

- El documento US 6319715 no prevé el uso de óxidos inorgánicos con porosidad controlada y alto volumen

de poro donde se puede introducir el agente terapéutico. Además, el documento citado describe una liberación pasiva en la que la proximidad entre partícula y célula es inducida por un proceso de sedimentación sin utilizar ninguna función de dirección.

- El documento US 2003/203206 describe una metodología de preparación de sílice mesoporosa hexagonal capaz de producir una liberación controlada de una sustancia incorporada. Se proporciona un grupo funcional orgánico foto-dimerizable en la abertura de poro que bloquea su entrada. La sustancia activa incorporada puede liberarse donde y cuando se desea después de una división fotoinducida del dímero.

**[0015]** El documento US 2003/203206 describe un sistema para el transporte de sustancias biológicamente activas en una matriz de sílice mesoporosa provista de un sistema para el control de la difusión de las mismas sustancias, pero no capaz de dirigirse a tejidos característicos a través de un mecanismo de reconocimiento.

- El documento WO01/12846 reivindica un método para la preparación de soporte cargado con biomoléculas constituidas por la etapa de: a) activación de la superficie de soporte a través de un silano que lleva un grupo amínico; b) carga de la superficie activada del soporte con biomoléculas; c) tratamiento del soporte cargado con una solución ácida, básica o neutra. El método puede utilizarse, por ejemplo, en la preparación de sondas analíticas en serie. En este método, los grupos amínicos presentes después de la carga de la biomolécula (que podrían generar interacciones indeseables en el medio donde se usa el soporte cargado) se eliminan selectivamente de la superficie sin afectar a la parte cargada de la superficie. El método de la invención es aplicable en todas las situaciones en las que los grupos amínicos libres deben eliminarse selectivamente de la superficie del óxido metálico cargado con biomoléculas.

**[0016]** El pH de la solución en la que el soporte cargado puede tratarse, depende sustancialmente de la clase de la molécula unida a la superficie y en la unión (covalente o adsorción). Los soportes preparados a través del método de la invención son muy útiles para herramientas de diagnóstico como, por ejemplo, en las sondas analíticas. Por ejemplo, a este respecto son series o microestructuras muy adecuadas sin grupos amínicos libres. La serie puede incluir diferentes biomoléculas en diferentes puntos que permiten la detección de múltiples analitos. Generalmente, un analito es una sustancia, normalmente una biomolécula, cuya detección es posible debido a su capacidad de interactuar específicamente con un determinado reactivo. Una muestra que incluye un analito se pone en contacto con el soporte cargado preparado mediante el método descrito en la invención. El analito se deja reaccionar con una biomolécula que está unida a la superficie del soporte. La interacción puede seguirse a través de un método de detección.

**[0017]** El documento WO 01/12846 describe un sistema basado en una superficie donde biomoléculas o diferente tipo de biomoléculas en diferentes "puntos" capaces de reconocer otras especies en una mezcla se injertan o se adsorben. Además, no prevé el transporte de ningún agente terapéutico y el reconocimiento se finaliza a la detección.

#### Descripción detallada

**[0018]** La invención se ha realizado a partir de óxidos inorgánicos con porosidad regular. El control de porosidad se lleva a cabo durante la síntesis mediante el uso de cualquier tensioactivo o a través de un mecanismo de impresión molecular. Se pueden proporcionar óxidos de una función introducida durante la síntesis del material o mediante un proceso de injerto post-síntesis. La función introducida es útil para el injerto de moléculas o partículas diferentes de naturaleza y tamaño sobre la superficie externa del material mesoporoso. Donde no se especifica, tal molécula o partícula serán nombradas genéricamente como **función de direccionamiento**. Entre la posible conjugación de la superficie externa, particularmente importante parece ser el uso de moléculas biológicamente activas o implicadas en el reconocimiento celular, péptidos o anticuerpos. La funcionalización se agrega sólo a la superficie externa utilizando el material de fabricación antes de los procesos de extracción que hacen que los poros internos sean accesibles a los reactivos.

**[0019]** La introducción de la función de la orientación se produce antes de la eliminación de tensioactivo y la inmovilización de la sustancia activa.

**[0020]** El injerto de la función de la orientación reduce drásticamente las condiciones operativas necesarias sucesivamente para la eliminación de tensioactivo. De hecho, deben ser compatibles con la estabilidad química y la actividad biológica del grupo introducido. El volumen de poros disponible después de los procesos de extracción es útil para la carga del fármaco y el transporte de sustancias biológicamente activas para su liberación en el sitio diana. Se pueden llevar moléculas, átomos, iones que tienen tipos y tamaños muy diferentes, tales como fármacos antitumorales, antiinflamatorios, hormonas, péptidos, fragmentos de ADN. Cuando no se especifica la molécula, ion, o material serán indicados genéricamente con el término **sustancia activa**.

**[0021]** El enfoque a la síntesis, funcionalización y carga del fármaco de nano y microsistemas modulares es completamente innovador y las condiciones operativas para ser elegidas deben evaluarse en función del problema específico a resolverse.

**[0022]** A modo de ejemplo, las siguientes consideraciones generales pueden ser útiles como una regla en el diseño de un nano- o microsistema modular:

- 1) La molécula dirigida está unida a la función química mediante enlace covalente o iónico.
- 2) La inclusión del fármaco se obtiene por adsorción en los poros del material.
- 3) El sistema debe tener una alta afinidad para la adsorción de la molécula huésped.
- 4) La liberación puede ser difusiva con perfil lento o controlado por pH en entornos en los que el pH es diferente al del medio donde se administra el sistema.
- 5) Las funciones químicas pueden obtenerse utilizando reactivos de 3-aminopropiltriétoxosilano o cualquier alcóxido de silicio parcialmente hidrolizable. Están presentes sobre todo en la superficie externa de la sílice por razón de impedimento estérico y en los poros internos. De hecho, en el caso de los materiales de sílice obtenidos mediante el método de funcionalización post-síntesis, aunque la modificación se lleva a cabo en materiales con poros rellenos de tensioactivo, la sílice híbrida alcanza las paredes internas por migración del reactivo a través de micelas y posterior condensación en las paredes.
- 6) El proceso de extracción del tensioactivo del poro después de la funcionalización debe ser compatible con la preservación de la actividad biológica de la función de direccionamiento. Puede llevarse a cabo en agua a temperatura ambiente o ligeramente superior, en un disolvente que no dañe la función de direccionamiento ni en un extractor soxhlet a temperatura moderada. La carga de fármaco es posible incluso en presencia completa o parcial de tensioactivo, siendo el propio agente tensioactivo un agente dispersante y un vehículo. La elección de los elementos que constituyen un sistema modular como la matriz, el agente de funcionalización, la función de focalización y el fármaco es una de las fases del diseño del sistema y se basa en consideraciones farmacológicas, biológicas, físicas y químicas. En la fase de diseño están también implicados el conocimiento de la cinética de adsorción del fármaco en el disolvente seleccionado para la carga del fármaco y de la liberación del fármaco del sistema en la administración, fluido cruzado y de liberación.

## SECCION EXPERIMENTAL

### Ejemplos de preparación de óxidos y óxidos funcionalizados con porosidad regular.

Proceso A1)

**[0023]** Preparación de un material compuesto de sílice-micelas.

**[0024]** Se emplean los siguientes reactivos: polioxietileno (10) isononilfeniléter (Nonfix 10 Condea), silicato de sodio (14% de NaOH, 27% de SiO<sub>2</sub>; Aldrich), HCl al 37% (Carlo Erba).

**[0025]** El silicato de sodio se añade a la solución de tensioactivo después de la solubilización completa. Se añade ácido hidroclórico y el gel resultante se envejece durante 24 horas a temperatura ambiente y sucesivamente durante 24 horas adicionales a 100°C en un autoclave de acero inoxidable teflonado. La composición molar del gel es:



**[0026]** Se añaden 36,5 g de silicato de sodio a la solución de agente tensioactivo (7,25 g de Nonfix 10 en 143,5 g de H<sub>2</sub>O) después de la disolución completa de Nonfix 10. Por último, se añaden 13,32 g de HCl al 37% y el gel resultante se envejeció durante 24 horas a temperatura ambiente y sucesivamente durante 24 horas adicionales a 100°C. La suspensión resultante se filtra, se lava y se seca a 80°C.

Proceso A2)

**[0027]** Preparación de un material compuesto de sílice-micelas.

**[0028]** Se emplean los siguientes reactivos: polioxietileno (10) isononilfeniléter (Nonfix 10 Condea), tetraetilortosilicato (Aldrich) y acetato de etilo (Aldrich). La composición molar del gel es:



donde TEOS indica ortosilicato de tetraetilo.

**[0029]** 13,77 g de Nonfix 10 se disuelven en 150 g de agua destilada y 13,80 g de TEOS se disuelven en 25,0 g de acetato de etilo.

**[0030]** La fase orgánica que disuelve TEOS se añade lentamente a la solución de agua de tensioactivo. El sistema se envejece a temperatura ambiente durante 8 días bajo agitación lenta. La fase orgánica se separa y la suspensión resultante se filtra, se lava y se seca a 80°C.

65

Proceso A3)

**[0031]** Preparación de un material compuesto de sílice-micelas.

**[0032]** Se emplean los siguientes reactivos: polioxietileno (10) isononilfeniléter (Nonfix 10 Condea) y tetraetilortosilicato (Aldrich) e i-octano (Carlo Erba). La composición molar del gel es:

TEOS-2,65i-octano-0,38Nonfix10-126,2H<sub>2</sub>O.

**[0033]** 16,74 g de Nonfix 10 se disuelven en 150 g de agua destilada y se disuelven 13,80 g de TEOS en 20 g de i-octano.

**[0034]** La fase orgánica que disuelve TEOS se añade lentamente a la solución acuosa de tensioactivo. El sistema se envejece a temperatura ambiente durante 8 días bajo agitación lenta. La fase orgánica se separa y la suspensión resultante se filtra, se lava y se seca a 80°C.

Proceso A4)

**[0035]** Preparación de un material compuesto de sílice-micelas.

**[0036]** Se emplean los siguientes reactivos: polioxietileno (10) isononilfeniléter (Nonfix 10 Condea), tetraetilortosilicato (Aldrich) y n-heptano (Aldrich). La composición molar del gel es:

TEOS-2,65n-heptano-0,38Nonfix10-126,2H<sub>2</sub>O

**[0037]** 16,74 g de Nonfix 10 se disuelven en 150 g de agua destilada y 13,78 g de TEOS se disuelven en 17,5 g de n-heptano.

**[0038]** La fase orgánica que disuelve TEOS se añade lentamente a la solución de agua de tensioactivo. El sistema se envejece a temperatura ambiente durante 8 días bajo agitación lenta. La fase orgánica se separa y la suspensión resultante se filtra, se lava y se seca a 80°C.

Proceso A5)

**[0039]** Preparación de un material compuesto de sílice-micelas.

**[0040]** Se emplean los siguientes reactivos: polioxietileno (10) isononilfeniléter (Nonfix 10 Condea), tetraetilortosilicato (Aldrich), i-octano (Carlo Erba) y etilenglicol (Aldrich).

**[0041]** La composición molar del gel es:

TEOS-2,65i-octano-0,38Nonfix10-25,6 H<sub>2</sub>O-24,3 glicol de etileno.

**[0042]** 100,0 g de etilenglicol y 16,7 g de (Nonfix 10 se disuelven en 30,5 g de agua destilada y 13,80 g de TEOS se disuelven en 20,0 g de i-octano.

**[0043]** La fase orgánica que disuelve TEOS se añade lentamente a la solución de agua/etilenglicol de tensioactivo. El sistema se envejece a temperatura ambiente durante 26 días bajo agitación lenta. La fase orgánica se separa y la suspensión resultante se filtra, se lava y se seca a 80°C.

Proceso B)

**[0044]** Preparación de una sílice mesoporosa 3-aminopropilo. Método directo. Ejemplo de método AminoPropiloSiliceDirecto (APSD).

**[0045]** Se emplean los siguientes reactivos: polioxietileno (10) isononilfeniléter (Nonfix 10 Condea), silicato de sodio (14% de NaOH, 27% de SiO<sub>2</sub>; Aldrich), HCl al 37% (Carlo Erba) y 3-aminopropiltrióxisilano (Aldrich). La composición molar del gel es:

TEOS-0,78NaOH-0,067Nonfix10-0,82HCl-0,042APTES-58,9H<sub>2</sub>O

donde APTES es 3-aminopropiltrióxisilano.

**[0046]** Se añaden 36,5 g de silicato de sodio a la solución de agente tensioactivo (7,25 g de Nonfix 10 en 143,5 g de H<sub>2</sub>O) después de la disolución completa de Nonfix 10. Por último, 13,32 g de HCl 37% y 45 g de APTES y el gel resultante se envejece durante 24 horas a temperatura ambiente y sucesivamente durante 24 horas adicionales a 100°C. La suspensión resultante se filtra, se lava y se seca a 80°C.

Proceso C)

**[0047]** Preparación de una sílice mesoporosa 3-aminopropilo. Método directo.

**[0048]** Se emplean los siguientes reactivos: polioxietileno (10) isononilfeniléter (Nonfix 10 Condea), tetraetilortosilicato (Aldrich) y 3-aminopropiltrietoxisilano (Aldrich).

**[0049]** La composición molar del gel es:

TEOS-0,235 Nonfix10-0,061APTES-133,5 H<sub>2</sub>O

**[0050]** El tensioactivo Nonfix 10 (9,8 g, 0,0148 mol) se disuelve completamente en 150 g de agua destilada a temperatura ambiente. Se añaden sucesivamente TEOS (13,0 g, 0,0624 moles) y APTES (0,85 g, 0,0038 moles). La mezcla se envejece bajo agitación lenta durante 8 días a temperatura ambiente. La suspensión resultante se filtra, se lava y se seca a 80°C.

Proceso D)

**[0051]** Preparación de una sílice mesoporosa 3-aminopropilo. Funcionalización post-síntesis de la sílice mesoporosa. Síntesis ejemplar de amino-propil-silicio (APSP) 3 g de sílice mesoporosa obtenida según los procedimientos A1, A2, A3, A4, A5 se activan en el horno durante 2 horas a 120°C y luego se suspenden en 25 ml de tolueno anhidro. Se añaden sucesivamente APTES (5 ml) y la suspensión se mantiene a reflujo durante 7 horas. Después, el sólido se filtra y se lava con tetrahidrofurano.

#### **Ejemplos de anclaje de ácido fólico sobre sílice mesoporosa 3-aminopropilo.**

Proceso E) Preparación de una muestra derivada de APSD o APSP de ácido fólico (APSD-FOL o APSP-FOL)

**[0052]** Se añadió trietilamina (0,25 ml) y ácido fólico (0,5 g) se disuelven en dimetilsulfóxido (15 ml). Después de disolución completa, nitrometano (3 ml) y sílice mesoporosa 3-aminopropilo (36 g) obtenido según el procedimiento B, C o D y previamente activado en el horno a 110°C durante 2 horas, se añaden. Finalmente, se añaden 2,27 mmoles de dicitclohexilcarbodiimida (0,47 g) o diisopropilcarbodiimida (0,29 g). Las mezclas se agitan durante 30 horas en la oscuridad.

**[0053]** Proceso F) Preparación de un sistema de ácido fólico APSP o APSD.

Se añadió trietilamina (0,25 ml) y ácido fólico (0,5 g) se disuelven en dimetilsulfóxido (15 ml). Después de la disolución completa, nitrometano (3 ml) y sílice mesoporosa 3-aminopropilo (3,6 g) obtenido según el procedimiento B, C o D y previamente activado en el horno a 110°C durante 2 horas, se añaden. Las mezclas se agitan durante 30 horas en la oscuridad.

#### **Ejemplo de proceso de extracción de tensioactivo**

**[0054]** Proceso G) extracción de tensioactivo de APSD-FOL o APSP-FOL (Muestras APSD-FOL-E o APSP-FOL-E).

**[0055]** El tensioactivo se elimina por consecutivos ciclos de extracción con 3 gramos de material en 1 litro de agua destilada a 30°C durante 12 horas con el fin de preservar la actividad biológica del ácido fólico.

#### **Ejemplos de procesos de carga del fármaco en sílice de ácido fólico-aminopropilo mesoporoso.**

**[0056]** Proceso H) Preparación del sistema de 3-aminopropilo mesoporosa de sílice/ácido fólico/cisplatino. Las muestras APSD- FOL-E/cisplatino o APSP-FOL-E/cisplatino.

**[0057]** La impregnación de cisplatino en el ácido fólico/sílice mesoporosa 3-aminopropilo se lleva a cabo por un proceso de remojo. 107 mg de material se suspenden durante 24 horas bajo agitación continua a temperatura ambiente en una solución de cisplatino en agua (38 mg en 45 ml). Sucesivamente, el sólido se filtró, se lavó con 400 ml de agua bidestilada durante 2 horas y se secó a 50°C.

**[0058]** Proceso I) Preparación del sistema de sílice/ácido fólico/oxaliplatino de 3-aminopropilo mesoporoso. Las muestras APSD- FOL-E/oxaliplatino o APSP-FOL-E/oxaliplatino.

**[0059]** La impregnación de oxaliplatino en sílice/ácido fólico de 3-aminopropilo mesoporoso después de la extracción de surfactante se lleva a cabo como en el proceso de H. Se suspenden 100 mg de materiales durante 24 horas bajo agitación continua a temperatura ambiente en una solución de oxaliplatino en agua ( 5 mg en 6,3 ml). Sucesivamente el sólido se filtró, se lavó con 400 ml de agua bidestilada durante 2 horas y se secó a 50°C.

## RESULTADOS

[0060] El proceso de síntesis A permite preparar materiales ordenados mesoporosos que exponen, después de la activación, el área de superficie específica alrededor de 1000 m<sup>2</sup>/g y el volumen muy alto de poro como se muestra por el patrón de XRD en polvo (Figura 1) e isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno (Figura 2). La funcionalización post-síntesis se lleva a cabo sobre el material compuesto de sílice-micelas antes de la eliminación de tensioactivo de modo que el agente de modificación se dirige preferentemente sobre la superficie externa de la partícula. El agente de modificación también puede migrar a través de las micelas y condensarse en las paredes de los poros internos como se ha demostrado en la literatura abierta para algún tipo de sílice mesoporosa.

[0061] La Tabla 1 muestra los resultados del análisis elemental sobre materiales de sílice mesoporosas 3-aminopropilo mesoporosos obtenidos de acuerdo con los procesos de B (directo) y D (modificación post-síntesis) indicados como APSD y APSP, respectivamente.

Tabla 1

Muestra	C (% en peso)	H (% en peso)	N (% en peso)
APSD	24,06	4,10	1,01
APSP	11,00	3,02	2,99

[0062] La presencia de nitrógeno en los materiales confirma el anclaje covalente de grupos aminopropilo y sugiere que, en el caso de proceso de post-síntesis en tolueno a 110°C, una extracción parcial de tensioactivo es posible. Espectro de <sup>13</sup>C RMN-MAS de la muestra APSP se muestra en la Figura 3.

[0063] La Figura 4 muestra el patrón de difracción DRX en polvo de una muestra APSD-FOL-E obtenida después de la unión covalente de ácido fólico en la superficie de una sílice mesoporosa de 3-aminopropilo extraída por agente tensioactivo (APSD-FOL). La única reflexión en el patrón de XRD (Figura 4) se mantiene durante los procesos de funcionalización y de extracción de tensioactivo. El espectro de FT-IR de material APSD-FOL-E muestra bandas típicas de molécula de ácido fólico. La Figura 6 muestra las isothermas de nitrógeno de adsorción-desorción de muestra APSD-FOL (curva inferior) y APSD-FOL-E (curva superior). El procedimiento de extracción produce un volumen de poro notable con mesoporos de tamaño homogéneo.

[0064] La Tabla 2 muestra los datos del análisis elemental y la composición modular de materiales APSD-FOL-E y APSP-FOL-E (moles/moles de sílice). Composición modular se refiere al sistema supramolecular y en particular a las cantidades relativas de cada unidad que constituyen el sistema híbrido.

[0065] La Figura 7 muestra la variación de la relación orgánica/SiO<sub>2</sub> como una función de los procesos de extracción y se hace referencia al material APSD-FOL.

Tabla 2

Muestra	Relación molar (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -NH <sub>2</sub> /SiO <sub>2</sub>	Relación molar ácido fólico/SiO <sub>2</sub>	Relación molar Nonfix 10/SiO <sub>2</sub>
APSD-FOL-E	0,0610	0,0138	0,0116
APSP-FOL-E	0,154	3,12 · 10 <sup>-3</sup>	3,10 · 10 <sup>-3</sup>

[0066] Proceso de síntesis A2, A3, A4, A5 y C se desarrollan con el fin de producir micelas de sílice compuestas con morfología controlada a la escala nanométrica. Estructuras mesoporosas a escala macroscópica se obtienen en la región interfacial utilizando sistemas de agua-aceite a pH ácido. Mesoestructuras obtenidas reprodujeron el tamaño y la morfología de las esferas de petróleo porque los materiales inorgánicos se condensan alrededor de ellos. La agitación representa un mecanismo para controlar las propiedades de emulsión, ya que afecta las fuerzas hidrodinámicas de largo alcance. Agitación lenta permite obtener morfología esencialmente fibrosa, mientras que al aumento de la velocidad de agitación partículas con morfologías esféricas se producen. Un sistema de dos niveles bifásicos se utiliza para producir membranas autoportantes en la interfaz estática entre las fases acuosa y orgánica [S. Schacht, P. Huo, IG-Martin Voigt, GD Stucky, F. Schuth, Science, 273, (1996) 768].

[0067] Más recientemente, una película mesoporosa se ha preparado a través de la separación de los reactivos en dos fases separadas, tanto en medio ácido como en medio básico [L. Faget, A Bergman, O. Regev, Thin Solid Films, 386 (2001) 6].

[0068] En nuestros experimentos, síntesis se llevan a cabo a temperatura ambiente y la condensación de sílice se produce en la región interfacial entre la solución de agua-tensioactivo inferior y la fase orgánica superior que contiene la fuente de sílice que alimenta la formación del material.

**[0069]** En estas condiciones el tamaño de partículas es limitado debido a las partículas recién formadas se mueven de la región interfacial y migran por la gravedad a la parte inferior del recipiente de síntesis donde sílice no está presente.

5 **[0070]** La carga de fármaco del medicamento contra el cáncer cisplatino y oxaliplatino (procesa H y I) se llevan a cabo en dos cantidades diferentes, respectivamente, del material obtenido por proceso de extracción de tensioactivo (APSD-FOL-E).

10 **[0071]** Las Tablas 3 muestran los resultados obtenidos a partir del análisis elemental de las muestras obtenidas por procesos de remojo H y I, (APSD-FOL-E/cisplatino y APSD-FOL-E/Oxaliplatino, respectivamente).

Tabla 3.

15

Muestra	Relación molar Pt/SiO <sub>2</sub>
APSD-FOL-E/cisplatino	0,00485
APSD-FOL-E/oxaliplatino	0,0030

## Reivindicaciones

1. Micro o nano-sistemas constituidos de una matriz a base de óxido inorgánico con porosidad normal controlada a través del uso de un tensioactivo genérico o mediante el uso de un mecanismo de impresión molecular, siendo micro o nano-sistemas adecuados para la orientación activa de moléculas, átomos o iones con actividad biológica y dirigiéndose a la liberación local en compartimentos biológicos de interés terapéutico, **caracterizado porque** los poros contienen una sustancia biológicamente activa, que una sustancia dedicada a la orientación y el reconocimiento molecular seleccionado de ácido fólico, un péptido, un anticuerpo, un glucósido, un carbohidrato o una proteína se acopla selectivamente sobre la superficie externa de dichos micro o nano-sistemas, y que la sustancia acoplada selectivamente sobre la superficie externa no es la sustancia biológicamente activa contenida dentro de los poros.
2. Procedimiento para la preparación de un micro o nano-sistema hecho de una matriz a base de óxido inorgánico con una porosidad regular de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en el que los óxidos inorgánicos están provistos de una función química introducida durante la síntesis de micro o nano-sistema o a través de un proceso post-síntesis de injerto en la superficie externa del micro o nano-sistema mesoporoso, en el que la molécula dirigida a diana está vinculada a la función química a través de enlace covalente o iónico y en el que las moléculas, átomos o iones con actividad biológica se cargan en los poros del micro o nano-sistema después de la molécula dirigida a diana está vinculada a la función química y después de la eliminación de agente tensioactivo, **caracterizado porque** el proceso de anclaje de ácido fólico como sustancia de orientación, se produce con o sin un agente de condensación de la siguiente manera: - 0,25 ml de trietilamina y 0,5 g de ácido fólico se disuelven en 15 ml de dimetilsulfóxido y, cuando la disolución es completa, nitrometano y óxidos inorgánicos activados previamente en el horno a 110°C durante 2 horas se añaden, se añade o no 2,27 mmoles de dicitohexilcarbodiimida o diisopropilcarbodiimida y mezclas finalmente se agitan durante 30 horas en la oscuridad.
3. Procedimiento para la preparación de un micro o nano-sistema según la reivindicación 2 en el que la matriz basada en óxido inorgánico se prepara usando los siguientes reactivos: isononilfeniléter polioxietileno, silicato de sodio, HCl 37% y de acuerdo a los siguientes pasos: se añade sodio-silicato a una solución de tensioactivo después de la solubilización completa; se añade ácido hidroclicórico y el gel resultante se envejece durante 24 horas a temperatura ambiente y sucesivamente por otras 24 horas a 100°C en un autoclave de acero inoxidable recubierto de teflón, la suspensión resultante se filtró, se lavó y se secó a 80°C.
4. Procedimiento para la preparación de un micro o nano-sistema según la reivindicación 2, en el que un óxido inorgánico provisto de una función química introducida durante la síntesis se prepara usando los siguientes reactivos: isononilfeniléter polioxietileno, ortosilicato de tetraetilo, 3-aminopropiltrióxosilano y agua, y de acuerdo con los siguientes pasos: un agente tensioactivo se disuelve en agua destilada, sucesivamente tetraetilortosilicato y 3-aminopropiltrióxosilano se añaden, la mezcla se envejece con agitación lenta durante 8 días a temperatura ambiente, la suspensión resultante se filtra, se lava y se seca a 80°C.
5. Procedimiento para la preparación de un micro o nano-sistema según la reivindicación 3 y 4 en el que la molécula dirigida a diana que es el ácido fólico está vinculado, a través de enlace covalente, a la función química, introducido durante la síntesis o a través de un proceso de post-síntesis de injerto, de óxido inorgánico usando los siguientes reactivos: trietilamina, ácido fólico, dimetilsulfóxido, nitrometano, dicitohexilcarbodiimida o diisopropilcarbodiimida, en el que trietilamina y ácido fólico se disuelven en dimetilsulfóxido, en el que, después de la disolución completa, nitrometano y óxidos inorgánicos previamente activados en el horno a 110°C durante 2 horas, se añaden, y en el que, finalmente, se añade dicitohexilcarbodiimida o diisopropilcarbodiimida, las mezclas se agitan durante 30 horas en la oscuridad.
6. Procedimiento para la preparación de un micro o nano-sistema según la reivindicación 5 en el que la molécula de focalización que es ácido fólico está vinculada, a través de enlace iónico, a la función química, introducida durante la síntesis o a través de un proceso de injerto de síntesis posterior, de óxido inorgánico usando los siguientes reactivos: trietilamina, ácido fólico, dimetilsulfóxido, nitrometano, en el que trietilamina y ácido fólico se disuelven en dimetilsulfóxido, en el que después de disolución completa, se añaden nitrometano y óxidos inorgánicos previamente activados en el horno a 110°C durante 2 horas, y en el que las mezclas se agitan durante 30 horas en la oscuridad.
7. Procedimiento para la preparación de un micro o nano-sistema según la reivindicación 5 o 6 en el que dicho tensioactivo se elimina de óxidos inorgánicos provistos de una función química vinculada con la molécula de focalización ácido fólico: el tensioactivo se elimina por ciclos consecutivos de extracción con 3 gramos de material en 1 litro de agua destilada a 30°C durante 12 horas con el fin de preservar la actividad biológica del ácido fólico.
8. Procedimiento para la preparación de un micro o nano-sistema según la reivindicación / en el que el cisplatino u oxaliplatino se carga en los poros del micro o nano-sistema después de la eliminación de agente tensioactivo: micro o nano-sistemas se suspenden durante 24 horas bajo agitación continua a temperatura ambiente en una solución de cisplatino u oxaliplatino en agua, sucesivamente, el sólido se filtró, se lavó con agua bidestilada durante 2 horas y se secó a 50°C.

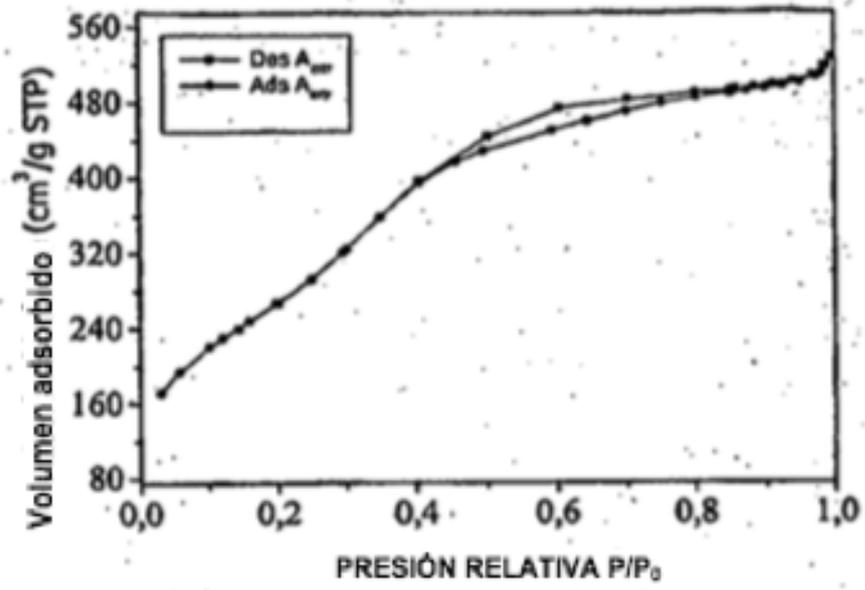


FIG. 2

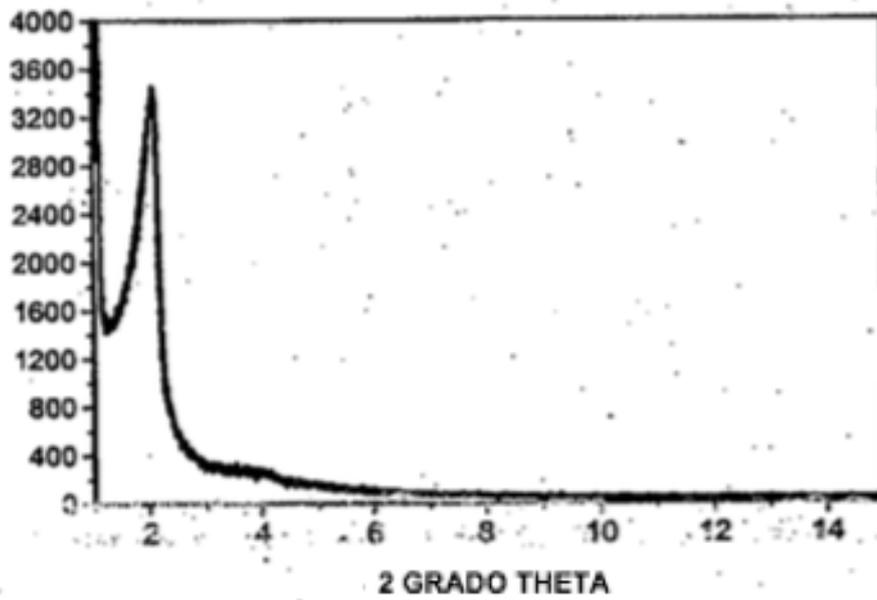


FIG. 1

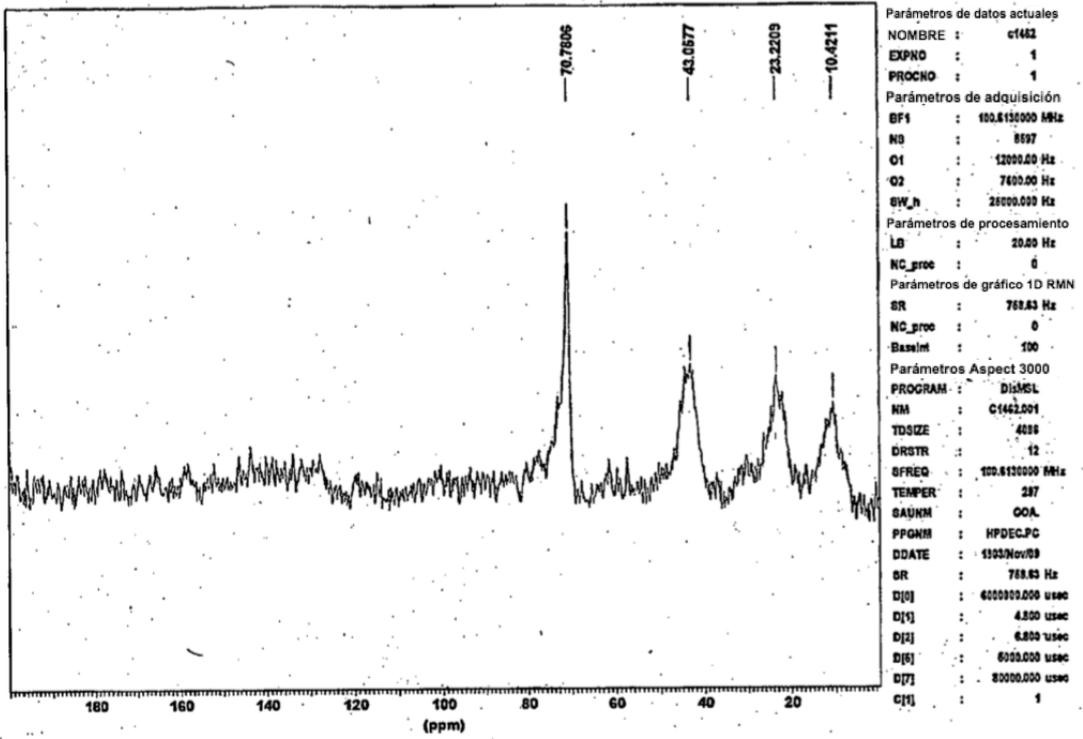


FIG. 3

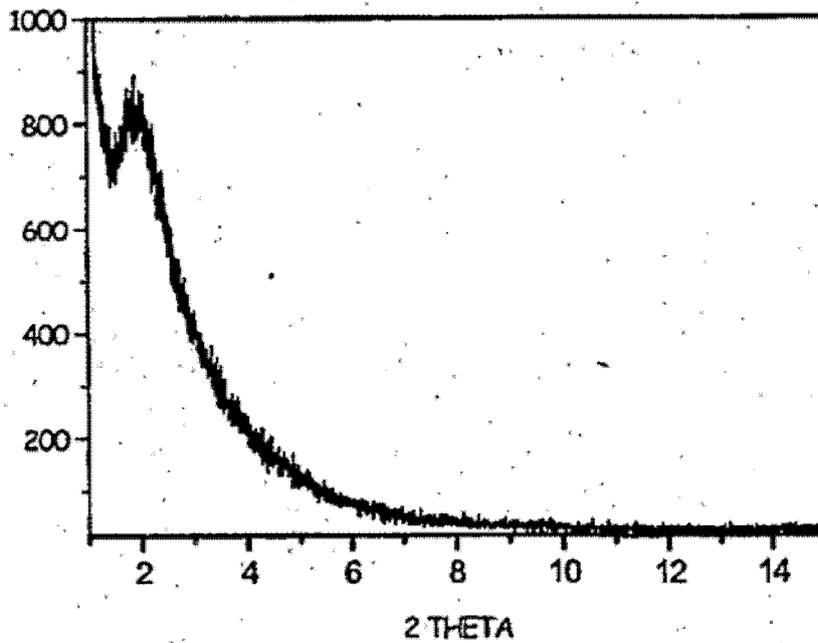


FIG. 4

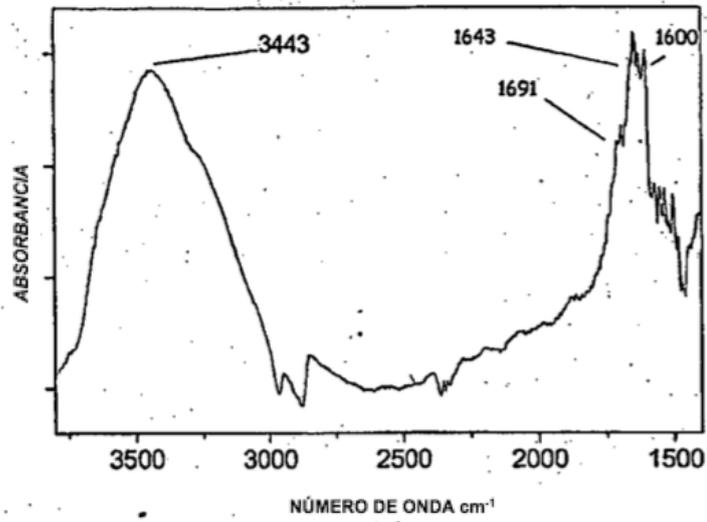


FIGURA 5

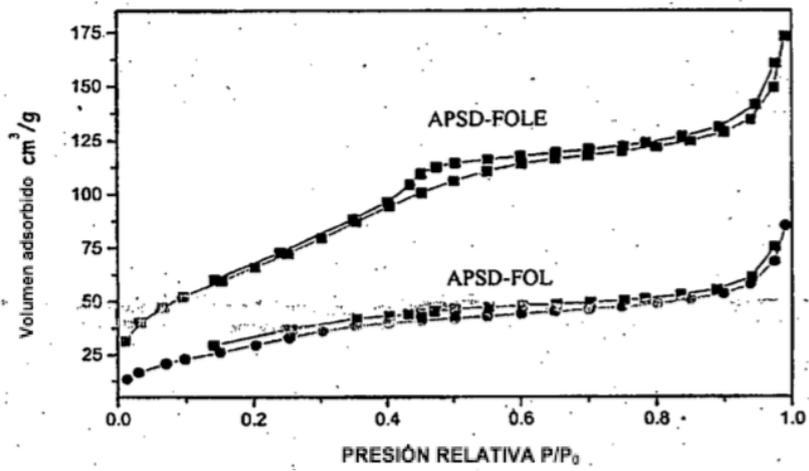


FIGURA 6

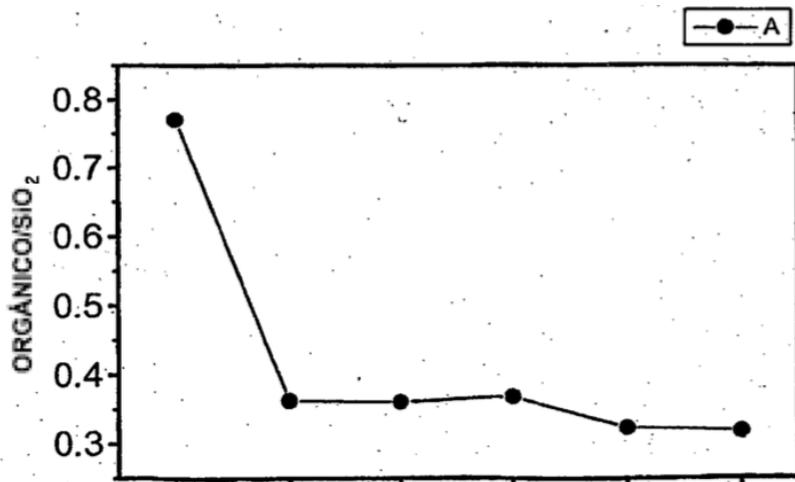


FIGURA 7

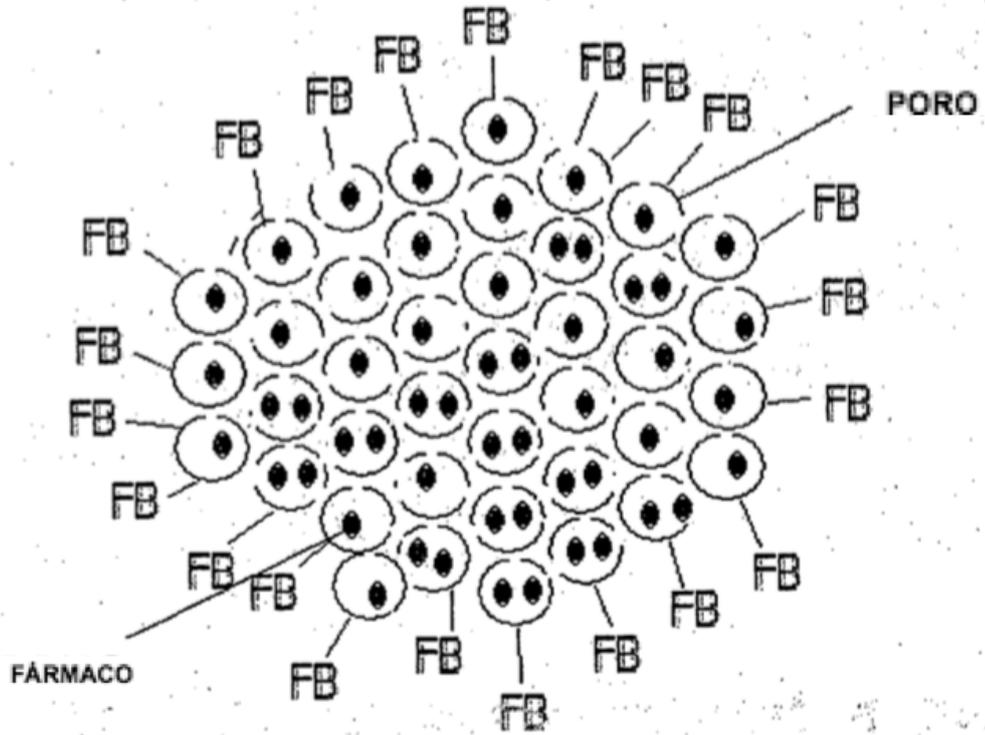


FIGURA 8